



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

**This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.**

출 원 번 호 : 특허출원 2003년 제 0068641 호
Application Number 10-2003-0068641

출 원 년 월 일 : 2003년 10월 02일
Date of Application OCT 02, 2003

출 원 인 : 주식회사 프로젠
Applicant(s) PROGEN CO., LTD.

2004 년 10 월 12 일

특 허 청
COMMISSIONER



BEST AVAILABLE COPY

【서지사항】	
서명]	특허출원서
분류구분]	특허
신청처]	특허청장
출원일자]	2003.10.02
명칭의 명칭]	인간 난포자극 호르몬을 대량으로 생산하는 방법
명칭의 영문명칭]	Method for mass production of human Follicle Stimulating Hormone
출원인]	
명칭]	주식회사 프로젠
출원인코드]	1-2000-012053-5
리인]	
성명]	이원희
대리인코드]	9-1998-000385-9
포괄위임등록번호]	2000-013594-1
명자]	
성명의 국문표기]	양세환
성명의 영문표기]	YANG,Se Hwan
주민등록번호]	700501-1042329
우편번호]	790-751
주소]	경상북도 포항시 남구 지곡동 낙원아파트 5동 305호
국적]	KR
명자]	
성명의 국문표기]	성영철
성명의 영문표기]	SUNG,Young Chul
주민등록번호]	560507-1010410
우편번호]	790-310
주소]	경상북도 포항시 남구 대잠동 현대이동홈타운 101동 601호
국적]	KR
명자]	
성명의 국문표기]	나규흠
성명의 영문표기]	NA,Kyu Heum
주민등록번호]	630210-1052512

【우편번호】	442-470		
【주소】	경기도 수원시 팔달구 영종동 청명동신아파트 312동 1303호		
【국적】	KR		
【성명】	이성희		
【성명의 국문표기】	LEE, Sung Hee		
【성명의 영문표기】	LEE, Sung Hee		
【주민등록번호】	590906-1387114		
【우편번호】	151-815		
【주소】	서울특별시 관악구 봉천11동 179-58 낙성대현대아파트 101동 306호		
【국적】	KR		
【성명】	김원배		
【성명의 국문표기】	KIM, Won Bae		
【성명의 영문표기】	KIM, Won Bae		
【주민등록번호】	470801-1011928		
【우편번호】	135-270		
【주소】	서울특별시 강남구 도곡동 467-6 대림아크로빌아파트 1801호		
【국적】	KR		
【사칭구】	청구		
【생물기탁】	한국 세포주 연구 재단(KCLRF)		
【기탁기관명】	KCLRF-BP-00082		
【수탁번호】	2003.06.20		
【수탁일자】	12		
【서열개수】	참부		
【서열등록의 전자파일】	특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인 이원희 (인)		
【지】			
【수수료】			
【기본출원료】	20	면	29,000 원
【가산출원료】	14	면	14,000 원
【우선권주장료】	0	건	0 원

【심사청구료】	11	항	461,000	원
▶【합계】	504,000	원		
【감면사유】	소기업 (70%감면)			
【감면 후 수수료】	151,200	원		
※부서류】	1. 요약서·명세서(도면)_1종 2.미생물기탁증명서_1종 3. 소기업임을 증명하는 서류_1종			

【요약서】

요약

본 발명은 인간 난포자극 호르몬을 대량으로 생산하는 방법에 관한 것으로, 보상제하게는 인간 난포자극 호르몬 유전자를 포함하는 발현벡터, 이를 도입한 형질환체 및 상기 형질전환체를 이용하여 인간 난포자극 호르몬을 대량으로 생산하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 발현벡터 및 형질전환체를 이용하면 인간 난포자극 호르몬을 대량으로 생산할 수 있어 이를 이용한 불임 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

표도

도 3

【명세서】

발명의 명칭

인간 난포자극 호르몬을 대량으로 생산하는 방법(Method for mass production of an Follicle Stimulating Hormone)

도면의 간단한 설명

- 도 1은 본 발명의 Rc/CMV-DHFR-TPL-FSH 벡터를 제조하는 모식도이다.
- 도 2a는 본 발명의 pSK-FSH- α 벡터에서 발현되는 hFSH- α 소단위의 cDNA 염기서열 및 아미노산 서열을 나타낸 것이다.
- 도 2b는 본 발명의 pSK-FSH- β 벡터에서 발현되는 hFSH- β 소단위의 cDNA 염기서열 및 아미노산 서열을 나타낸 것이다.
- 도 3은 Rc/CMV-dhfr-TPL-FSH 벡터를 COS-7 세포에 도입하여 인간 FSH의 발현율을 효소 면역 측정법으로 확인한 그래프이다.
- 도 4는 MTX $1\ \mu\text{M}$ 농도에 적응된 세포를 한계희석(limiting dilution)법으로 선택한 클론의 인간 FSH 발현량을 확인한 효소 면역측정 그래프이다.
- 도 5는 인간 FSH 유전자가 CHO 세포의 염색체내에 삽입되어 있는지를 확인한 SH 결과 사진이다.

발명의 상세한 설명】

발명의 목적】

발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

본 발명은 인간 난포자극 호르몬을 대량으로 생산하는 방법에 관한 것으로, 보구체적으로는, 인간 난포자극 호르몬 유전자를 포함하는 발현벡터, 상기 벡터를 침도입한 형질전환체 및 상기 형질전환체를 이용하여 인간 난포자극 호르몬을 대량로 생산하는 방법에 관한 것이다.

난포자극호르몬(Follicle-stimulating hormone, 이하 "FSH"라 약칭함)은 뇌하수전엽에서 분비되는 당단백질로 분자량이 약 32,600 Da이고, α 와 β 소단위(ubunit)가 비공유적으로 결합된 불균일 2본쇄 당단백질(heterodimeric glycoprotein)이다. 불균일 2본쇄 당단백질에는 FSH, 뇌하수체 당단백질인 황체 호르몬(Luteinizing hormone, 이하 "LH"라 약칭함), 태반 당단백질인 융모성 성선 자극 호르몬(human chorionic gonadotropin, 이하 "hCG"라 약칭함), 갑상선 자극 호르몬(hyroid stimulating hormone, 이하 "TSH"라 약칭함), 혈액응고 8인자(Factor VIII), IL-12 등이 있다. FSH의 α 소단위는 구조적인 면에서 LH, TSH 및 hCG의 α 소단위 매우 유사하고, 면역학적으로도 큰 차이를 보이지 않는다. 그러나, β 소단위는 호르몬마다 다르기 때문에 호르몬마다 다른 생물학적, 면역학적인 특성을 부여한(Pierce, J.G and Parsons, T.F., *Ann. Rev. Biochem.*, 50, 465-495, 1981).

히, 인간 난포자극 호르몬(human FSH, hFSH)은 난소의 난포를 자극하여 난포의 발

을 촉진시킴으로써 배란을 유도하는 역할을 하는 호르몬으로 불임증치료에 사용되
* 있다. 현재, 대부분의 FSH 제제는 임신부의 뇨로부터 정제하여 사용하고 있는데
양이 매우 적고 분리하기 어렵다는 단점이 있다. 따라서, FSH는 세균이나 효모를
용한 일반적인 유전공학 기술로는 생산이 어렵고 모든 당화 메커니즘을 갖추고 있
면서 체내에 존재하는 본래 형태의 당단백질을 안정한 형태로 생산할 수 있는 재조
동물세포주를 확립하는 기술이 필수적이다.

유전자 재조합 기술을 이용하여 당단백질 호르몬을 발현하는 형질전환 세포주를
제조하는데 있어서, 일반적으로는 대장균, 효모, 곤충세포 또는 동물세포 등이 숙주
세포로 사용될 수 있다. 그러나, 숙주세포 각각의 당화능이나 당화체계가 다르기 때
에 당단백 호르몬을 제조하기 위한 숙주세포를 선택할 때에는 당화능이나 당화체계
가장 우선적으로 고려하여야 한다. 특히, 인간 난포자극 호르몬의 경우는 당이
호르몬의 생체내 활성에 절대적으로 중요한 역할을 하기 때문에 당화능이 우수한 숙
주세포를 선택하는 것이 매우 중요하다. 예를 들어, 상피 세포 중 대장균은 당
화능이 전혀 없으며, 효모나 곤충세포의 경우에는 당화능은 있지만 주로 고
노즈형 (high mannose type)의 당단백질을 생성하거나 인간 FSH와 같은 복합형
(complex type) 당단백질을 생성시키기에는 당화능이 낮기 때문에 숙주세포로는 적절
하지 못하다. 또한, 당화능이나 당화체계를 비교적 잘 갖춘 포유동물 세포라 할지라도
세포주의 특성에 따라 당화되는 정도나 형태가 다르기 때문에, hFSH와 같이 치료
로 사용되는 당단백질을 제조할 때는 인체내에서 항원성 등을 유발시키지 않고 안

하며 높은 생체내 활성을 나타낼 수 있는 당구조를 생성할 수 있는 포유동물 세포를 숙주세포로 선택하여야 한다.

또한, 동물세포에서 FSH, LH, hCG, TSH, 혈액응고 8인자 및 IL-12 등과 같은 단일 2번째 당단백질을 대량 생산하기 위해서는 우선 효율적인 발현벡터를 개발하는이 필수적이다. 이를 위해 주로 사용되는 벡터의 구성 요소로는, 유전자 발현조에 중요한 역할을 하는 프로모터 (promoter), mRNA를 안정화시켜 유전자의 전사효율 증가시킬 수 있는 인트론 (intron), mRNA의 안정성을 높일 수 있는 폴리아데닐레이션 모티프 (polyadenylation motif, pA) 및 선별 마커 (selection marker) 등이 있다.

이에, 본 발명자들은 인간 FSH를 안정적으로 고발현하는 발현벡터를 제조하고, 이를 당화능력이 뛰어난 숙주세포에 형질도입하여 FSH를 안정적으로 대량 생산할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[발명이 이루고자 하는 기술적 과제]

본 발명의 목적은 인간 FSH 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터, 상기 벡터를 형질도입한 형질전환체 및 상기 형질전환체를 이용하여 인간 FSH를 대량으로 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용]

상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 인간 FSH 유전자를 포함하는 재조합 발

백터를 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 백터를 숙주세포에 형질도입한 형질전환체를 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 형질전환체를 이용하여 인간 FSH를 대량으로 생산하는 방

을 제공한다.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 인간 FSH 유전자를 포함하는 재조합 발현 백터를 제공한다.

동물세포에서 FSH, LH, hCG, TSH, 혈액응고 8인자 및 IL-12 등과 같은 불균일 2

쇄 당단백질을 대량 생산하기 위해서는 우선 효율적인 발현백터를 개발하는 것이

수적이다. 이에, 본 발명에서는 다음과 같은 여러 가지 요소를 고려하여 제작한,

간 FSH를 대량 생산하기 위한 고효율 발현백터를 제공한다.

1) hFSH를 코딩하는 유전자는 별도의 유전자로부터 전사되는 α 와 β 의 두개의

단위로 구성되어 있다. 두 개의 서로 다른 당단백질을 한 세포에서 발현시켜 불균

이본쇄를 만들기 위해 본 발명의 바람직한 실시예에서는

CV(encephalocycarditis virus)의 IRES(Internal ribosomal entry site)를 사용하

으며, 이를 hFSH α 소단위 유전자와 hFSH β 소단위 유전자 사이에 삽입하여 hFSH

, β 소단위 유전자를 동시에 발현하도록 하였다. 즉, 본 발명의 발현백터에 포함

는 hFSH를 코딩하는 유전자는 서열번호 1로 기재되는 FSH α 소단위 유전자와 서열
번호 2로 기재되는 FSH β 소단위 유전자를 포함하는 것이 바람직하며, 상기 소단위
전자를 동시에 발현시키기 위해 상기 FSH α 소단위 유전자와 FSH β 소단위 유전자
이에 서열번호 7로 기재되는 IRES 서열을 삽입한 유전자인 것이 더욱 바람직하다.

2) 프로모터 (promoter)는 유전자 발현을 조절하는데 있어 가장 중요한 역할을
는 것으로 알려져 있다. 이에, 본 발명의 발현벡터는 프로모터 유전자를 포함하도
제조된다. 본 발명의 발현벡터에 포함되는 프로모터는 현재까지 가장 강력한 프
모터로 알려진 서열번호 8로 기재되는 사이토메갈로바이러스 (cytomegalovirus,

V) 초기 유전자 (early gene)의 프로모터인 것이 바람직하다.

3) 포유동물 유전자들은 인트론 (intron)을 포함하는데 인트론이 있을 때가 없을
때보다 발현 수준이 현저히 증가된다는 보고가 있다 (Korb *et al.*, *Nucleic Acids*
s. 25, 5901-5908, 1993). 이는 인트론이 mRNA를 안정화시키고 전사효율을 증가시
기 때문인 것으로 사료되었다. 이에, 본 발명의 발현벡터는 인트론 서열을 포함하
도록 제조되며, 인트론 서열은 서열번호 9로 기재되는 아데노바이러스 (adenovirus)
리파티트 리더 서열 (tripartite leader sequence, 이하 "TPL"이라 약칭함)인 것이
람직하다.

4) mRNA의 안정성을 높이기 위해서는 폴리아데닐레이션 모티프 (polyadenylation
tif, pA)가 중요하다 (Drummond

al., *Nucleic Acids Res.* 25, 7375-7394, 1985). 본 발명의 발현벡터는 폴리아데닐레이션 모티프를 포함하며, 폴리아데닐레이션 모티프는 서열번호 11로 기재되는 40 바이러스 초기 유전자의 폴리아데닐레이션 모티프 (polyadenylation motif) 및 / 는 서열번호 12로 기재되는 소 성장 호르몬 (bovine growth hormone, BGH) 유전자의 리아데닐레이션 모티프 (polyadenylation motif) 인 것이 바람직하다. 본 발명의 바 직한 실시예에서는 FSH α 유전자 뒤쪽에 BGH pA, Neo 유전자 뒤쪽에 SV40 pA, fr 유전자 뒤쪽에 SV40 pA 유전자를 위치시켜 발현벡터를 제조하였다 (도 1 참조).

5) 본 발명의 발현 벡터를 형질도입하여 FSH를 과발현하는 세포주를 선별하기 해 선별 마커 유전자가 필요하다. 이에, 본 발명의 발현 벡터는 선별 마커 유전자 포함하도록 제조되며, 선별 마커 유전자는 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 유래 세포 인 CHO/dhfr⁻ 세포에서 선별을 용이하게 하기 위한 선별마커 유전자인 서열번호 10 로 기재되는 디히드로폴레이트 리덕타제 (dihydrofolate reductase, 이하 "DHFR"이 약칭함) 유전자를 사용하는 것이 바람직하다. CHO/dhfr⁻ 세포는 DHFR 유전자가 손되어 핵산 생합성 과정이 불완전한 CHO 세포로써, DHFR 유전자를 포함하여 제작 본 발명의 FSH 발현 벡터를 상기 세포에 형질도입할 경우 핵산 합성 능력을 회복 게 되므로 FSH 발현 벡터가 도입되어 FSH를 발현하는 세포만 특이적으로 선별할 수 다.

따라서, 본 발명자들은 인간 FSH의 발현에 미치는 상기와 같은 다양한 인자들을 려하여 1) 인간 FSH를 코딩하는 유전자, 2) 프로모터 서열, 3) 인트론 서열, 4) 폴 아데닐레이션 모티프 서열 및 5) 선별마커 유전자를 포함하는 인간 FSH를 발현시키 위한 재조합 발현벡터를 제조하였다.

본 발명의 바람직한 실시예에서는 FSH α 와 FSH β 소단위를 한 세포에서 동시 발현시키기 위해서 FSH α 와 FSH β 소단위 유전자 사이에 IRES를 삽입하였고, 강력하다고 알려진 사이토메갈로바이러스 초기 유전자의 프로모터를 이용하여 SH 발현율을 극대화 하였으며, mRNA를 안정화 시키고 전사효율을 증가시키기 위해 트론을 포함하고 있는 아데노바이러스 트리파티트 리더 서열 (TPL)과 SV40 바이러스 유전자의 폴리아데닐레이션 모티프 및 소 성장 호르몬 유전자의 폴리아데닐레이션 모티프를 포함시켰다. 또한, 본 발명의 발현 벡터를 형질도입하여 FSH를 과발현하는 세포주를 선별하기 위한 마커 유전자로 DHFR 유전자를 포함시켰다.

본 발명자들은 상기 구성 요소들을 포함하는 발현 벡터를 제조하고, 이를 c/CMV-dhfr-TPL-FSH'라 명명하였다.

본 발명의 발현벡터는 불균일 2본쇄 당단백질인 인간 난포자극 호르몬 유전자를 발현하기 위한 벡터로 제작된 것으로, 불균일 2본쇄 당단백질을 대량으로 생산할 수 있는 효율적인 발현 벡터이다. 따라서, 본 발명의 발현벡터에 포함되는 인간 난포자극 호르몬 유전자 대신에 불균일 2본쇄 당단백질인 LH, hCG, TSH, 혈액응고 인자 및 IL-12 유전자를 포함하도록 발현 벡터를 제조할 수 있으며, 이렇게 제조된 발현 벡터가 상기 유전자로부터 코딩되는 단백질을 대량생산하는데 유용하게 사용될 수 있다는 것은 당업자에게 있어서 자명하다.

또한, 본 발명은 상기 제조한 발현 벡터를 숙주세포에 형질도입한 형질전환체를 공한다.

본 발명에서는 인체내에서 고활성을 나타내는 인간 난포자극 호르몬의 고발현 세포주를 제조하기 위하여, 당화능이나 당화체계가 비교적 잘 갖춰져 있으면서 인체에서 항원성을 유발하지 않고 안전하며 높은 생체내 활성을 나타낼 수 있는 당구조를 생성하는 포유동물 세포 중 햄스터 세포주인 차이니즈 햄스터 난소(Chinese hamster ovary, 이하 "CHO"라 약칭함) 세포를 숙주세포로 이용한다.

CHO 유래 세포주인 CHO/dhfr⁻ 세포는 DHFR 유전자가 훼손되어 핵산 생합성 과정에 불완전한 CHO 세포로써, 본 발명의 FSH 발현 벡터(RcCMV-dhfr-TPL-FSH)에 포함된 FR 유전자로 인하여 발현 벡터를 가진 CHO 세포는 핵산 합성 능력을 회복하게 된다. 따라서, 핵산이 없는 세포 배양액으로 CHO 세포를 배양함으로써 발현 벡터를 가진 세포만의 선별이 가능하다. 또한, DHFR 기질 유사체인 메토크세이트(methotrexate, MTX)가 첨가된 배양액에서 세포가 성장하는 것은 DHFR 유전자가 세포에서 증폭됨으로써 가능한데, 본 발명의 FSH 발현 벡터는 DHFR 유전자를 포함하고 있으므로 FSH 유전자도 동시에 증폭된다. 따라서, 세포 배양액에 DHFR의 기질 유사인 MTX를 첨가함으로써, FSH 발현 세포군의 FSH 단백질 발현 정도를 개선할 수 있다.

본 발명에서는 FSH를 발현하는 벡터를 CHO/dhfr⁻ 세포에 형질 감염시킨 후 고농도의 MTX에서 고발현하고 동질성(homologous)을 나타내는 클론을 선별 배양하여 FSH 안정적으로 고발현 되는 세포주를 확립하였다(도 3 내지 도 5 참조). 이렇게 선별된 FSH 고발현 세포주를 "DPFC325"라 명명하고, 2003년 6월 20일자로 한국 세포주 연구 재단(Korean Cell Line Research Foundation, KCLRF)에 기탁하였다(수탁번호: LRF-BP-00082).

또한, 본 발명은 상기 형질전환체를 이용하여 인간 FSH를 대량 생산하는 방법을 제공한다.

본 발명의 인간 FSH를 대량 생산하는 방법은

1) 인간 FSH 유전자를 포함하는 발현 벡터를 제조하는 단계:

2) 단계 1의 발현 벡터를 숙주 세포에 형질도입시키는 단계:

3) 단계 2의 형질도입된 형질전환체를 선별하는 단계:

4) 단계 3에서 선별된 재조합 형질전환체로부터 안정적으로 FSH를 생산하는 재조합 형질전환체를 선별하는 단계: 및

5) 단계 4의 재조합 형질전환체를 배양하여 생산되는 FSH를 수득하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

상기 단계 1에 있어서, 발현벡터는 인간 FSH를 코딩하는 유전자, 프로모터 열, 인트론 서열, 폴리아데닐레이션 모티프 서열 및 선별마커 유전자를 포함하는 것이 바람직하고, 본 발명에서 제조한 벡터인 "Rc/CMV-dhfr-TPL-FSH" 벡터인 것이 더욱 바람직하다.

상기 단계 2에 있어서, 숙주 세포는 DHFR 유전자가 훼손되어 핵산 생합성 과정 불완전한 CHO 세포인 CHO/dhfr⁻ 세포인 것이 바람직하다.

상기 단계 4에서 선별된 안정적으로 FSH를 생산하는 재조합 형질전환체는 2003 6월 20일자로 한국 세포주 연구 재단에 기탁된 "DPFC325"인 것이 바람직하다 (수탁 호: KCLRF-BP-00082).

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 한정되는 것은 아니다.

실시예 1> 제조합 hFSH 발현벡터 (Rc/CMV-dhfr-TPL-FSH)의 제조

-1> 인간 FSH α 소단위와 β 소단위 유전자의 준비

제조합 인간 FSH를 발현하는 세포주를 제조하는데 필요한 구조 유전자를 제조하기 위해 사람 뇌하수체 cDNA 라이브러리로부터 인간 FSH α 소단위와 β 소단위 유전자 PCR 방법으로 증폭하였다. 보다 구체적으로는, 주형으로 사람 뇌하수체 cDNA 라이브러리 (Clontech, cat#HL1139a)를 사용하였고, 서열번호 1로 기재되는 FSH α 소단위 유전자의 염기서열 및 서열번호 2로 기재되는 FSH β 소단위 유전자의 염기서열을 고하여 중합효소 연쇄반응에 사용할 프라이머를 제조하였다. FSH α 소단위와 β 소단위 유전자를 증폭시키기 위한 프라이머의 서열은 다음과 같다.

1) FSH α 소단위

센스 프라이머 (서열번호 3): AGCGCCATGGATTACTACAGAAAATAT (밀줄친 부분은 Nco I 식부위).

안티센스 프라이머 (서열번호 4): GGGGGATCCGGGCCCTTAAGATTTGTGATAATTAACA (밀줄친 부분은 BamH I, Apa I 인식부위)

2) FSH β 소단위

센스 프라이머 (서열번호 5) : GGGGGCGGCCGCAGGATGAAGACACTCCAGTTT (밑줄친 부분은 Not I 인식부위).

안티센스 프라이머 (서열번호 6) : GGGGATATCTTATTCTTTTCATTTCACC (밑줄친 부분은 Not I 인식부위)

뇌하수체의 cDNA 라이브러리 전체 분획을 주형으로 이용하고, 상기 제조된 각 프라이머쌍 (α 소단위: 서열번호 3과 서열번호 4, β 소단위: 서열번호 5와 서열번호 6)를 이용하여 PCR 반응을 실시하였다. PCR 반응의 조건은 94℃에서 30초간 반응을 하고, 이후 94℃에서 30초, 57℃에서 30초, 72℃에서 30초간의 일련의 반응을 30번 반복한 뒤에, 최종적으로 72℃에서 5분간 반응을시켰다. 이러한 조건은 FSH α , FSH β 소단위를 증폭하는데 모두 동일하게 적용되었다.

-2> FSH α , FSH β 소단위 유전자 동시 발현 벡터의 제조

FSH는 FSH α 와 FSH β 소단위로 구성되어 있기 때문에 FSH α 소단위와 FSH β 소단위를 한 세포에서 동시에 발현시키는 벡터를 제조하기 위해 서열번호 7로 기재된 EMCV (encephalomyocarditis virus)의 IRES (Internal ribosomal entry site)를 도입하여, 상류 위치 (upstream)에 β 소단위를 두고, 하류 위치 (downstream)에 α 소단위 위치하도록 디자인하였다.

먼저 상기 실시예 <1-1>에서 증폭된 FSH β 소단위 유전자 (390 뉴클레오타이드) T4 폴리뉴클레오타이드 키나제로 처리한 뒤, Hinc II 제한효소를 처리한 pSK 벡터

trategene사)에 블런트(blunt) 라이게이션(ligation) 형태로 클로닝하여, 이를 "K-FSH- β "라고 명명하였다. 다음으로 상기 실시예 <1-1>에서 증폭한 FSH α 소단 유전자(351 뉴클레오타이드)를 Nco I와 BamH I으로 절단한 뒤, EMCV IRES를 지니 있는 pSK-IRES 벡터(Ha *et al.*, *Nat. Biotech.*, 2002, 20, 381)의 Nco I와 BamH I 치에 삽입하여, "pSK-IRES-FSH- α "라고 명명하였다. pSK-FSH β 벡터를 Xho I과 oR V로 절단하여 제조한 FSH- β DNA 절편을 Xho I과 EcoR V로 절단한 pSK-IRES-FSH- 벡터에 삽입하여, FSH- α 소단위 및 FSH- β 소단위 유전자를 동시에 가진 벡터를 제조하고, 이를 "pSK-FSH- α /IRES/FSH- β "라 명명하였다.

최종적으로 FSH- α 소단위 및 FSH- β 소단위 유전자를 동물 세포주에서 발현시키기 위한 벡터를 제조하였다. 이를 위해 서열번호 8로 기재되는 강력한 사이토메갈로 바이러스(cytomegalovirus, CMV) 프로모터를 보유하고 있는 RcCMV 플라스미드(nvitrogen사)를 기본 벡터로 이용하였으며, 발현수준을 높이기 위해 pTV2 벡터(Lee *et al.*, *J. Virol.*, 1998, 72, 8430)에 있는 서열번호 9로 기재되는 아데노바이러스(denovirus) 트리파티트 리더 서열(tripartite leader sequence, TPL)을 도입하였고 유전자 발현을 증폭하기 위하여 서열번호 10으로 기재되는 생쥐 디히드로폴레이트 덕타제(dihydrofolate reductase, DHFR) 유전자를 포함하며 상기 유전자 뒤에 서열번호 11로 기재되는 SV40 pA 유전자를 포함하는 pSV2-dhfr 벡터(ATCC 37146)로부터 열번호 10으로 기재되는 DHFR 유전자를 도입하여 발현 벡터를 제조하고, 이를 "CMV-dhfr-TPL"이라 명명하였다. 다음으로 상기 pSK-FSH- α /IRES/FSH- β 벡터를 t I으로 절단하여 FSH- α /IRES/FSH- β 절편을 제조하고, 이를 Rc/CMV-dhfr-TPL 벡터의 Not I 부위에 삽입하여 FSH를 과발현하기 위한 발현 벡터를 제조하고 "

/CMV-dhfr-TPL-FSH^{*}라 명명하였다 (도 1). 이후, Rc/CMV-dhfr-TPL-FSH 플라스미드^{*} 위치한 FSH- α 소단위 유전자와 FSH- β 소단위 유전자의 DNA 서열은 생거 등의 법 (Sanger *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 74, 5463-5467, 1977) 으로 최종 분석하였다.

그 결과, 본 발명의 발현 벡터에 삽입된 FSH- α 소단위 및 FSH- β 소단위 유전자 서열은 기존에 보고된 FSH- α 소단위 및 FSH- β 소단위 유전자와 동일한 유전자 서열을 가짐을 확인하여 본 발명의 발현 벡터가 제대로 제조되었음을 확인하였다 (도 2a, 도 2b).

1시에 2> 인간 FSH 발현 세포주의 제조

상기 실시예 1에서 제조한 재조합 인간 FSH 발현벡터 (Rc/CMV-dhfr-TPL-FSH)를 포주에 형질도입시켜 재조합 인간 FSH가 발현되는지 확인하고자 하였다. 구체적으로, 배양중인 COS-7 세포 (ATCC, catalog # CRL-1651)를 60 mm 디쉬 플레이트당 50⁶ 개로 접종한 후에 18시간 동안 배양하였다. 이후, 배양액 (DMEM + 10% FBS)을 5 ml의 신선한 배지로 교체해 준 뒤에, 약 4시간 후 FSH 발현 벡터인 Rc/CMV-dhfr-TPL-FSH 플라스미드 또는 대조군 벡터인 Rc/CMV-dhfr-TPL 플라스미드

CaPO₄ 동시침전 (coprecipitation) 방법으로 형질도입시켰다. 즉, 먼저 각 DNA 10 μl을 순수한 증류수와 혼합하여 최종 부피가 225 μl가 되도록 한 후, 2.5 M CaCl₂ 용액 25 μl를 넣어 볼텍서 (vortex)로 혼합하였다. 상기 DNA가 들어있는 튜브에 2 × S 용액 (280 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.5 mM Na₂HPO₄·2H₂O, 12 mM 맥스트로스, 50 mM PES) 250 μl를 한 방울씩 천천히 떨어뜨려 주었다. 이후 10분간 상온에서 반응을 겨준 후, 세포 배양 접시에 넣어주고, 6시간 동안 배양하였다. 이후 PBS로 3번 세한 뒤, 다시 신선한 배양배지를 첨가해 48시간 동안 배양하였다.

실시예 3> 효소면역 측정법을 이용한 hFSH 발현 확인

상기 실시예 2에서 Rc/CMV-dhfr-TPL-FSH 플라스미드 또는 대조군 플라스미드인 /CMV-dhfr-TPL로 형질도입된 COS-7 세포의 배양액을 이용하여 일시적으로 과 발현는 FSH의 발현양을 조사하였다. FSH 검출을 위해 효소면역 측정 키트 (MEDI-CORP, t# KTSF 3651)를 이용하여 측정하였으며, 제조사의 프로토콜에 따라 수행하였다. 체적으로는, 먼저 형질감염된 후 48시간이 지난 세포배양액과 키트에 있는 표준액 100 μl씩 항-인간 FSH가 코팅되어 있는 웰 (well)에 첨가하여 상온에서 30분간 플리트 진탕기 (plate shaker) 위에서 반응을 시켰다. 이후, 제조사의 세척액으로 3세척한 후에, HRP (Horse Redish Peroxidase)가 결합되어 있는 항-인간 FSH 항체를 0 μl씩 첨가하여 상온에서 플레이트 진탕기 위에서 반응을 시켰다. 반응 30분 후 세척액으로 3번 세척하고, 기질액을 100 μl씩 넣어 상온

서 플레이트 진탕기 위에서 반응을 시켰다. 반응한지 약 15분 후에 반응정지액 0 μ l를 넣어 450 nm의 흡광도로 측정하였다. 키트 제조사에서 제공하는 표준액의 도와 얻어진 흡광도 값을 이용하여, 표준곡선 및 함수를 얻은 뒤에, 이를 이용하여 FSH의 양을 정량화 하였다.

그 결과, 대조군 플라스미드 Rc/CMV-dhfr-TPL를 형질도입한 세포에서는 인간 H가 거의 검출되지 않은 반면, Rc/CMV-dhfr-TPL-FSH 플라스미드를 형질도입한 세포 서는 인간 FSH가 과발현되었다 (도 3).

3> hFSH 발현 CHO 세포주의 제조

상기 실시예 3에서 hFSH를 과발현함을 확인한 Rc/CMV-dhfr-TPL-FSH 벡터를 DHFR 전자가 훼손되어 핵산 생합성 과정이 불완전한 중국 햄스터 난소 (Chinese Hamster ary) 세포 (CHO/dhfr-) (Urlaub

al., *Somat Cell Mol Genet*, 12, 555-566, 1986)에 형질도입시켜 hFSH 단백질을 대량 생산할 수 있는 세포주를 제조하였다. 구체적으로, hFSH 과발현 벡터를 형질도입하기 전에 CHO/dhfr- 세포를 해동하여 T-75 플라스크에 넣은 후 HT 보충제 (supplement) (GIBCO BRL사)와 10% 투석된 소 태아 혈청을 첨가한 MEM- α 배지 (GIBCO L사)로 약 80 내지 90%의 세포밀도가 될 때까지 배양하였다. 플레이트에 부착하여 자라는 세포에 트립신 (trypsin)을 처리하여 세포를 수득한 후 5×10^5 개의 세포를 60 디쉬에 플레이팅 (plating) 하였다. 이들 세포에 FSH 발현 벡터인 CMV-dhfr-TPL-FSH를 상기 실시예 3에 기재된 CaPO_4 동시침전 방법으로 형질 도입한 후, 이틀간 추가 배양하였다. 배양 후, 형질도입된 CHO/dhfr- 세포를 여러 배수 (1/2, 1/5, 1/10, 1/20, 1/50, 1/100, 1/200, 1/500)로 희석하여 HT 보충제를 넣지 않은 배지로 100 mm 디쉬에서 배양하면서 1차 스크리닝을 수행하였다. 스크리닝 중은 일주일에 한번씩 배지만 갈아주고, 계대 (passage)는 거치지 않았으며, 이후, 약 3주에서 3주 후에 분리하기 좋게 콜로니가 형성된 플레이트를 선별하였다. 선별된 플레이트로부터 콜로니를 수득하여 24 웰 플레이트로 옮겨 계대배양하였다. 약 일주에서 2주일 후에 24 웰 플레이트에 있는 세포 클론에 트립신 처리하여 세포를 수득 뒤 2×10^4 세포수/웰 농도로 다시 24 웰 플레이트에 플레이팅 하였다. 48시간 후, 상층액을 수득하여 FSH 검출 ELISA 키트 (MEDI-CORP, cat# KTSF 3651)로 FSH 발현 레벨을 측정하였다. ELISA 측정으로 FSH 발현 레벨이 높은 세포주 클론을 다시 여 배수로 희석한 후 100 mm 디쉬에 넣어 배양하였다. 이 때, 사용배지에 MTX 20 nM 넣어 주어 2차 스크리닝에 들어갔으며, 이후 1차 스크리닝과 동일한 확인 절차를 거쳐 인간 FSH를 과발현하는 클론을 선별하였다.

실시예 5> hFSH 고발현 CHO 세포주의 선별

DHFR 결손세포인 CHO/dhfr⁻ 세포는 핵산 생합성 능력이 없기 때문에 핵산이 없
 최소 필수 영양배지인 MEM-α 배지 상에서는 생존할 수가 없지만, FSH 유전자와
 FR 유전자가 함께 도입된 재조합 CHO 세포는 핵산 생합성 능력이 있기 때문에 MEM-
 배지를 이용하여 선택 배양할 수 있다. 이에, hFSH 고발현 세포주를 선별하기 위
 여 MTX 농도 20 nM에서 1 μM까지 점진적으로 증가시킨 배양 배지에서 상기 실시예
 에서 선별된 클론을 배양하였다. 보다, 구체적으로, 1차로 선별된 클론들을 무석
 소 태아 혈청이 10% 함유된 MEM-α 배지에서 MTX 농도를 순차적으로 증가시키면서
 대 배양하였다. MTX 농도 단계별로 각각의 클론들을 배양하여 MTX 농도에 저항성
 갖는 클론들을 선별하였으며, 각 단계의 클론별로 배양 상등액의 FSH 발현량을 측
 함으로써 고발현 FSH 세포들을 2차로 선별하였다. 이때 FSH 발현량은 상기 실시예
 에서 기술한 효소면역 측정법을 이용하여 측정하였다.

3차 선별로서, MTX 증폭시 (amplification)의 이종성 (heterogeneity)을 줄이기
 해 한계희석법 (limiting dilution method)을 이용한 단일 클론 선별을 실시하였다.
 , 불균일한 FSH 발현율을 나타내는 클론들을 한계희석법을 이용하여 FSH 발현율이
 일하고 생산성이 우수한 단일세포를 분리하는 실험을 진행하였다. 3차 선별은 96
 플레이트에 세포를 웰당 1개 내지 2개의 클론씩 접종되도록 희석한 후 세포가 1개
 접종된 플레이트를 선별해 2-3주 배양한 후 콜로니를 형성하는 웰 플레이트의 세
 들 분리한 다음 계대배양하여 FSH의 발현량을 효소면역 측정법으로 측정하여 FSH들

2발현하는 단일 세포들을 분리하였다 (도 4). 3차 선별을 통해 분리된 세포주들 중 10⁶ μM MTX에서 안정한 증식특성과 FSH 고생산성을 나타내는 재조합 CHO 세포주들 최종 선별하여 "DPFC325"라 명명하고 2003년 6월 20일자로 한국 세포주 연구재단에 기탁하였다 (수탁번호: KCLRF-BP-00082호).

3. 실험예 6> FISH법에 의한 hFSH 유전자의 염색체내 삽입 확인

치료용 단백질을 생산하는 과정에 사용되는 세포 클론들은 유전적 안정성 (genetic stability)이 매우 중요하다. 세포가 성장하는 동안 세포주 내로 도입된 플라스미드 벡터가 다음세대로 안정적으로 계대되기 위해서는 CHO 세포의 염색체내에 통합 (integration)이 이루어져야만 한다. 재조합 세포주내 염색체상에 FSH 유전자가 삽입되어 있는지를 확인하기 위하여 본 발명에서는 FISH (Fluorescent In Situ hybridisation)법을 사용하였다. 즉, CHO 세포 중기 (metaphase)의 염색체와 간기 (interphase)의 핵을 바이오틴-표지된 프로브 (biotin-labeled probe)로 혼성화하였다. 프로브에 혼성화된 중기의 염색체는 형광물질이 결합된 아비딘 (avidine)과 함께 염색시켜 관찰하였다.

그 결과 조사된 거의 대부분의 간기 (interphase) 핵에서 반응색을 나타내어 염색체내에 FSH 유전자가 삽입되어 있음을 확인하였다 (도 5).

발명의 효과]

- 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 형질전환세포는 인간 난포자극 호르몬을 안정적이고, 대량으로 생산할 수 있으므로 불임증 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

특허청구범위]

청구항 1]

인간 난포자극 호르몬을 코딩하는 유전자, 사이토메갈로바이러스 초기 유전자의 프로모터 서열, 아데노바이러스 트리파티트 리더 서열, 폴리아데닐레이션 모티프 서 및 디히드로폴레이트 리덕타제 (DHFR) 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는 인간 난포자극 호르몬 유전자를 포함하는 발현 벡터.

청구항 2]

제 1항에 있어서, 인간 난포자극 호르몬 유전자는 서열번호 1로 기재되는 인간 포자극 호르몬 α 소단위 유전자, 서열번호 7로 기재되는 내부 리보솜 도입 부위 (internal ribosomal entry site) 서열 및 서열번호 2로 기재되는 인간 난포자극 호르몬 β 소단위 유전자로 구성되는 것을 특징으로 하는 발현 벡터.

청구항 3]

제 2항에 있어서, 사이토메갈로바이러스 초기 유전자의 프로모터 서열은 서열번호 8로 기재되는 염기서열인 것을 특징으로 하는 발현 벡터.

•

§구항 4]

제 2항에 있어서, 아데노바이러스 트리파티트 리더 서열은 서열번호 9로 기재된 염기서열인 것을 특징으로 하는 발현 벡터.

§구항 5]

제 2항에 있어서, 폴리아데닐레이션 모티프 서열은 서열번호 11로 기재되는 40 바이러스 초기 유전자의 폴리아데닐레이션 모티프 서열 및/또는 서열번호 12로 기재되는 소 성장 호르몬 유전자의 폴리아데닐레이션 모티프 서열인 것을 특징으로 하는 발현 벡터.

§구항 6]

제 2항에 있어서, 디히드로폴레이트 리덕타제 (DHFR) 유전자는 서열번호 10으로 재되는 염기서열인 것을 특징으로 하는 발현 벡터.

§구항 7]

제 1항의 발현 벡터를 숙주세포에 도입하여 난포 자극 호르몬을 대량으로 생산하는 제조합 형질전환체.

•

연구항 8]

제 7항에 있어서, 숙주 세포는 디하드로폴레이트 리덕타제 유전자가 훼손된 O (Chinese hamster ovary) 유래 세포주 (CHO/dhfr-)인 것을 특징으로 하는 재조합 질 전환체 (수탁번호: KCLRF-BP-00082호).

연구항 9]

- 1) 인간 난포자극 호르몬 유전자를 포함하는 발현 벡터를 제조하는 단계;
- 2) 단계 1의 발현 벡터를 숙주 세포에 형질도입시키는 단계;
- 3) 단계 2의 형질도입된 재조합 형질전환체를 선별하는 단계;
- 4) 단계 3에서 선별된 재조합 형질전환체로부터 안정적으로 인간 난포자극 호르몬을 생산하는 재조합 형질전환체를 선별하는 단계; 및
- 5) 단계 4의 재조합 형질전환체를 배양하여 생산되는 인간 난포자극 호르몬을 특하는 단계를 포함하는 인간 난포자극 호르몬을 대량으로 생산하는 방법.

연구항 10]

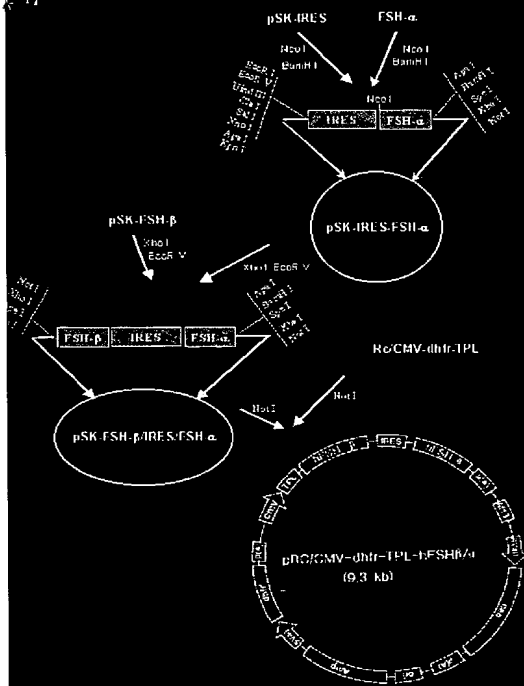
제 9항에 있어서, 단계 1의 발현 벡터는 제 1항의 발현 벡터인 것을 특징으로 하는 방법.

영구항 11]

제 10항에 있어서, 단계 4에서 선별된 재조합 형질전환체는 제 8항의 재조합 형질전환체인 것을 특징으로 하는 방법.

【도면】

11

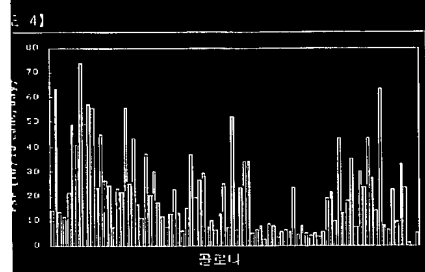
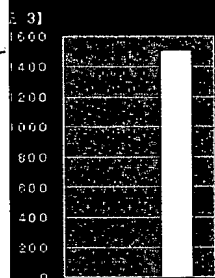


BEST AVAILABLE COPY

[illegible]

2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
2	1	2	3	4	5	6	7																																																																																													

BEST AVAILABLE COPY



BEST AVAILABLE COPY

【서열목록】

ProGen Co Ltd. <120> Method for mass production of human Follicle Stimulating
 none <130> 3p-07-33 <160> 12 <170> XopotentIn 1.71 <210> 1 <211> 351 <212>
 <213> Homo sapiens <400> 1 atggattact acagaaaata tgcagctatc ttcttggtca cattgtcgg
 tctgcat 60 ttcttcatt ccgtctctga tctgcaggat tcccagaat gcacgtaca ggaataacca
 ttcttctccc agccgggtgc ccaatactt cagtgcattgg gctgctgctt ctctagagca 180 tatccactc
 taaggtc caagaagacg atgttggtcc aaagaagcgt cacctcaag 240 tccacttgct gtgtagctaa
 atatac agggtcacag taatgggggg ttcaaaagt 300 gagaaccaca cggcgtgcca ctgcagtact
 tattatc acaaatctta a 351 <210> 2 <211> 390 <212> DNA <213> Homo
 iens <400> 2 atgaagacac tccagttttt ctctcttttc tgttgctgga aagcaatcg ctgcaatagc 60
 gactgca ccaacatcac cattgcaata gagaagaag aatgtcgttt ctgcataagc 120 atcaaacaca
 ggtgtgc tggctactgc tacaccaggg atctagtgtg taaggaccca 180 gccagcccca aaatccagaa
 atgtacc ttcaagggaac tggatatga aacagtgaga 240 gtgcccggct gtgtcacca tgcagattcc
 tatacat acccagtggc caccaggtg 300 cactgtggca agtctgacag cgacagcact gattgtactg
 gaggcct ggggcccagc 360 tactgctcct ttgtgaaat gaaagaataa
 <210> 3 <211> 27 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> sense primer
 human FSH alpha subunit <400> 3 agcgcctatgg attactacag aaaatat
 <210> 4 <211> 37 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> antisense
 ser for human FSH alpha subunit <400> 4 gggggatccg ggccttaag atttgata attaca
 <210> 5 <211> 33 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> sense primer
 human FSH beta subunit <400> 5 gggggcagcc gcaggatgaa gacactccag ttt
 <210> 6 <211> 27 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> antisense
 ser for human FSH beta subunit <400> 6 ggggatactt tattctttca ttccacc
 <210> 7 <211> 592 <212> DNA <213> Encephalomyocarditis virus <400> 7
 atcgaat tccccctctc cctccccccc cctaacggt actggccgaa gccgcttgga 60 ataaggccgg

```
tcgtttg tctatatgtt attttccacc atattgccgt cttttgcaa      120 tgtgaaggcc cggaaacctg
^tctctt ctgacgagc attcctaggg gtctttcccc      180 tctgccaaa ggaatgcaag gtctgttgaa
:gtgaag gaagcagttc ctctggaagc      240 ttcttgaaga caacaacgt ctgtagcgac ctttgcagg
:sgaacc ccccacctgg      300 cgacaggctc ctctgcggcc aaaagccacg tgtataagat acacctgcaa
:sgcaca      360 accccagtc cagtttgta gttagatagt tttggaaga gtcaaatggc tctctcaag
cgtattcaac aaggsgctga aggatgcca gaaggtacce cattgtatgg gatctgatct      480 ggggctcgg
acatgct ttacatgtgt ttagtgcagg ttaaaaaaac gtctaggccc      540 cccgaaccac ggggacgtgg
tcctttg aaaaacacga tgataaatgg cc      592 <210>      8 <211>      654 <212>      DNA
3>      Cytomegalovirus <220> <221>      promoter <222>      (1)..(654) <400>      8 gatgtacggg
gataaac gcgttgacat tgattattga ctagtatta atagtaatca      60 attacggggc cattagtcca
:ccatat atggagtttc gcgttacata acttacgta      120 aatggcccg cggctgacc gccaacgac
:ggccat tgacgtcaat aatgacgtat      180 gtcccatag taacgcaat agggacttic cattgacgtc
gggsga ctatttacgg      240 taaactgcc acttggcagt acatcaagt tatcatatgc caagtacgcc
tattgac      300 gtcaatgacg gtaaatggc cgcttgcat tatgccagat acatgacct atgggacttt
cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atgcctatta ccatggtgat gcggttttgg      420 cagtacatca
ggcgigg atagcgggtt gactcacggg gatttccaag tcgccacccc      480 attgacgtca atgggagttt
tggcac caaatcaac gggactttcc aaaatgtcgt      540 aacaactccg ccccatggac gcaaatgggc
agcggtg tacggtgsga ggtctatata      600 agcagagctc tctggctaac tagagaaccc actgcttaac
ttatcga aatt      654 <210>      9 <211>      441 <212>      DNA <213>      Artificial
ence <220> <223>      Adenovirus tripartite leader sequence <400>      9 tcgatactct cttccgcatc
gtctgcs agggccagct gttaggctcg cggttgagga      60 caaactcttc scggcttttc cagtactctt
tcgaaaa ccgctcgcc tcggaacggt      120 actccgccac cgaggagcct gagcgagtc gcatcgaccg
:sgaaaa cctctcgact      180 gttagggatga gtactccctc tcaaaagcgg gcatgacttc tgcgctaaga
tcagttt      240 ccaaaaaacga ggaaggattg atattcacct ggcgccggt gatgccttgg agggtagccc
cgtcacatcg gtcagaaaaag acaactcttt tgttgtcaag cttgaggtgt ggcaggcttg      360 agatctggcc
```

```

>acttga gtgacaatga catccacttt gccctttctt ccacaggtgt      420 ccactcccag gtccaactgc a
<210> 10 <211> 564 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
rdrofolate reductase <400> 10 atggtttgac cattgaactg catcgtcgc gtgtcccaaa atatggggat
:aagaac      60 ggagacctac cttgccctcc gctcaggaac gagttcaagt acttccaaag aatgaccaca
accctttcag tggaaagtaa acagaatctg gtgattatgg gtaggaaaac ctggttctcc      180 attcctgaga
atcgacc tttaaaggac agaattaata tagttctcag tagagaactc      240 aaagaaccac cacgaggagc
ttttctt gccaaaagtt tggatgatgc cttaagactt      300 attgaacaac cgggaattggc aagtaaaata
atggttt ggaatagtcgg aggcagttct      360 gtttaccagg aagccatgaa tcaaccaggc cacctcagac
ttgtgac aaggatcatg      420 caggaatttg aaagtacac gtttttccca gaaattgatt tggggaaata
acttctc      480 ccagaatacc caggcgtcct ctctgaggtc caggaggaaa aaggcatcaa gtataagttt
gaagtctacg agaagaaga ctac      564 <210> 11 <
> 130 <212> DNA <213> Simian virus 40 <220> <221> polyA_signal <222>
..(130) <400> 11 aacttgttta ttgcagctta taatggttac aaataaagca atagcatcac aaatttcaca
aataaagcat tttttcact gcattctagt tgggtttgt ccaaaactcat caatgtatct      120 tatcatgtct
<210> 12 <211> 232 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> bovine
eth hormone <220> <221> polyA_signal <222> (1)..(232) <400> 12 cttagagctcg
atcagcc tcgaactgic ctcttagttg ccagccatct gttgtttgcc      60 cctccccctg gccttctctg
:tggaag gtgccactcc cactgtcctt tectaataaa      120 atgaggaaat tgcatcgcat tgtctgagta
gtcattc tatcttgggg ggtggggggg      180 ggcaggacag caagggggag gattggggaag acaatagcag
tactggg ga      232

```

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/KR04/002474

International filing date: 24 September 2004 (24.09.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: KR
Number: 10-2003-0068641
Filing date: 02 October 2003 (02.10.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 15 October 2004 (15.10.2004)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse